

P/ ENT COOPERATION TREAT

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 24 May 2000 (24.05.00)	
International application No. PCT/DE99/02816	Applicant's or agent's file reference PCT/Bioserv 06
International filing date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)	Priority date (day/month/year) 08 September 1998 (08.09.98)
Applicant HEINRICH, Hans-Werner et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 07 April 2000 (07.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 08 DEC 2000

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/Bioserv 06	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02816	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/09/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/573		
Anmelder PRIVATES INSTITUT BIOSERV GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.12.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W Tel. Nr. +49 89 2399 7320 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 eingegangen am 20/10/2000 mit Schreiben vom 16/10/2000

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-18
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-18
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-18
	Nein: Ansprüche

- 2. Unterlagen und Erklärungen**
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PUNKT I:

Die veränderten Ansprüche gehen nicht über den Offenbarungsgehalt der ursprünglichen internationalen Anmeldung hinaus und erfüllen somit die Erfordernisse des Artikels 34 (2)(b) PCT.

PUNKT V:

Es wird auf folgendes Dokument verwiesen:

D1: US-A-5 622 837 (Scheefers H. et al.); in der Anmeldung erwähnt;
22. April 1997

1. NEUHEIT

Die **Ansprüche 1-19** entsprechen aus folgenden Gründen den Erfordernissen des Artikels 33(2) PCT:

- 1.1 Die **Ansprüche 1-6** sind neu, weil der verfügbare Stand der Technik (D1) lediglich die Bestimmung eines pankreatischen Elastase-Isoenzym (Elastase 1) offenbart (Zusammenfassung; Ansprüche 1-5).
- 1.2 Aus analogen Gründen sind auch die **Ansprüche 7 und 17-19** neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.
- 1.3 Auch die **Ansprüche 8-10** sind neu, weil die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide zur Antikörpergewinnung im verfügbaren Stand der Technik nicht offenbart ist.
- 1.4 Aus analogen Gründen sind auch die **Ansprüche 11-16** neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Die **Ansprüche 1-19** entsprechen aus folgenden Gründen auch den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT:

- 2.1 Im Vergleich zu Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, unterscheidet sich das Verfahren des vorliegenden **Anspruchs 1** dadurch, daß der Gesamtgehalt aller bekannten pankreatischen Elastasen bestimmt wird. Dieser Unterschied führt dazu, daß auch solche Elastase-Isoenzyme erfaßt werden, die mit dem herkömmlichen Elastase 1-ELISA nicht nachgewiesen werden können. Die mit Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein diagnostisches Verfahren bereitzustellen, das alle bekannten Elastase-Isoenzyme bestimmt. Da der Stand der Technik keinerlei Hinweise auf die in Anspruch 1 vorgeschlagene Lösung zu enthalten scheint, kann Anspruch 1 als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT).
- 2.2 Die **Ansprüche 2-6** sind von Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit.
- 2.3 Auch die **Ansprüche 7 und 17-19** scheinen erfinderisch im Sinne des Artikels 33(2) PCT zu sein, weil die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper die Bestimmung aller bekannten Elastase-Isoenzyme erlaubt.
- 2.4 Analoge Argumente gelten für die Verfahren der **Ansprüche 8-10**: Im Vergleich zu Dokument D1 unterscheiden sich die Verfahren dieser Ansprüche dadurch, daß die vier angegebenen Peptide als Antigen verwendet werden. Dieser Unterschied führt dazu, daß Antikörper erhalten werden, die mit alle bekannten Elastase-Isoenzyme detektieren. Die mit Anspruch 8 zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein Verfahren bereitzustellen, das die Gewinnung von derart kreuzreagierenden Antikörpern ermöglicht. Da die Verwendung der vier angegebenen Peptide aus dem Stand der Technik nicht nahegelegt zu sein scheint, erfüllen die Ansprüche 8-10 die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 2.5 Aus analogen Gründen können auch die Antikörper der **Ansprüche 11-12** und die Peptide der **Ansprüche 13-16** als erfinderisch im Sinne des Artikels 33(3) PCT angesehen werden.

3. **INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT**

Der Gegenstand der **Ansprüche 1-19** scheint gewerblich anwendbar zu sein und erfüllt somit die Erfordernisse des Artikels 33(4) PCT.

PUNKT VIII:

1. **Anspruch 2** wird nicht, wie in Artikel 6 PCT vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da sein Umfang aus folgendem Grund über den gerechtfertigten Umfang hinausgeht: Während die Beschreibung lediglich die Bestimmung Pankreas-Elastasen 1, 2 und 3 offenbart, beansprucht Anspruch 2 die Nutzung von Antikörpern, die "alle Elastase-Isoenzyme [...] erkennen". Jedoch werden Antikörper, die auch weitere, noch unbekannte Elastasen erkennen, durch die Beschreibung nicht gestützt.
2. **Anspruch 4** entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand seines Schutzbegehrens aus folgendem Grund weder klar definiert noch knapp gefaßt ist: Aufgrund des Ausdrucks "vorzugsweise" ist der kennzeichnende Teil dieses Anspruchs als rein optional anzusehen, so daß er sich nicht von Anspruch 3 unterscheidet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung, dadurch gekennzeichnet, daß in Serum, Se- oder Exkreten eines Patienten der Gesamtgehalt aller bekannten pankreatischen Elastasen (Isoenzyme) bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung mittels immunchemischer Systeme unter Nutzung mono- oder polyklonaler Antikörper erfolgt, die alle Elastase-Isoenzyme, mit Ausnahme des Elastase-Fragmentes mit der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg, einzeln spezifisch oder kreuzreaktiv erkennen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzten Antikörper mittels Antigenen gewonnen werden, die die kompletten Elastasen 1, 2 und 3 oder Untereinheiten davon darstellen, wobei die Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg als Elastase-Fragment oder eine immunologisch wirksame Teilsequenz davon nicht verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Antigene vorzugsweise folgende synthetische Peptide verwendet werden, die nach Immunisierung von Tieren Antikörper induzieren, die kreuzreaktiv mehrere Elastasen erkennen, wobei sie die Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg nicht betreffen:

NH₂-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH

NH₂-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH

NH₂-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH

NH₂-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH

NH₂-G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I-COOH

NH₂-H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V-COOH

NH₂-W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A-COOH

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NH₂-V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T-COOH

NH₂-G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q-COOH

NH₂-S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N-COOH

NH₂-K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D-COOH

NH₂-G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W-COOH

NH₂-G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L-COOH

NH₂-S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y-COOH

NH₂-F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T-COOH

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper einzeln oder in einer Kombination in immunchemischen Nachweissystemen verwendet werden.

6. Immunologische Testkits zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten, enthaltend einen oder mehrere in den Ansprüchen 2-5 verwendeten Antikörper.

7. Verfahren zur Gewinnung von mono- und/oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch mit humaner Elastase 1 in Stuhl oder Körperflüssigkeiten reagieren und durch übliche Immunisierungsverfahren induziert werden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q oder immunogene Teilpeptide davon als Antigen zur Immunisierung von Vertebraten, insbesondere von Kleinsäugetern und Vögeln, verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die freien Peptide vor der Immunisierung an geeignete Trägersubstanzen, vorzugsweise Hämocyanin oder Albumin koppelt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9. Verfahren nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale Antikörper unter Einsatz von Hühnern als Versuchstieren produziert werden.
10. Polyklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 7 bis 9 hergestellt wurden.
11. Monoklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 7 und 8 hergestellt wurden.
12. Peptid A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N
13. Peptid Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R
14. Peptid R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N
15. Peptid G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q
16. Reinigungs- und Detektionssysteme für humane Elastase 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen der erfindungsgemäßen Antikörper gemäß den Ansprüchen 10 und 11 enthalten.
17. Immunologische Testkits zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der Mucoviscidose unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten.
18. Immunologische Testkits nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß 2 unterschiedliche Antikörper verwendet werden (Sandwich-ELISA).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/Bioserv 06	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/02816	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/09/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/1998
Anmelder PRIVATES INSTITUT BIOSERV GMBH et al.		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/573 C07K16/40 C12N9/66

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 622 837 A (SCHEEFERS HANS ET AL) 22. April 1997 (1997-04-22) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Ansprüche -----	1-19

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/03/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pellegrini, P

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02816

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5622837 A	22-04-1997	DE 4107765 A	30-01-1992
		AT 128734 T	15-10-1995
		AU 646476 B	24-02-1994
		AU 8100291 A	02-03-1992
		CA 2088354 A	29-01-1992
		WO 9202630 A	20-02-1992
		DE 59106634 D	09-11-1995
		DK 547059 T	19-02-1996
		EP 0547059 A	23-06-1993
		ES 2080955 T	16-02-1996
		GR 3018483 T	31-03-1996
		JP 10080272 A	31-03-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/573, C07K 16/40, C12N 9/66		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/14542
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. März 2000 (16.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02816		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. September 1999 (03.09.99)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 198 40 900.1 8. September 1998 (08.09.98) DE 199 23 892.8 25. Mai 1999 (25.05.99) DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. Juni 2000 (02.06.00)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRIVATES INSTITUT BIOSERV GMBH [DE/DE]; Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINRICH, Hans-Werner [DE/DE]; Hauptstrasse 4, D-17498 Riemserort (DE). KLEINERT, Rainer [DE/DE]; Friedhofsweg 30, D-17493 Greifswald (DE). MEYER, Udo [DE/DE]; Mitteldorfstrasse 4, D-18239 Hastorf (DE). WAGNER, Heinz-Jürgen [DE/DE]; Walter-Friedrich-Strasse 3, D-13125 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: DIAGNOSTIC METHOD FOR DETECTING DISTURBANCES OF THE PANCREAS			
(54) Bezeichnung: DIAGNOSTISCHES VERFAHREN ZUR ERKENNUNG EINER PANKREASFUNKTIONSTÖRUNG			
(57) Abstract <p>Disclosed is a method for detecting disturbances in the functioning of the pancreas, whereby parts of all elastase isoenzymes produced in the pancreas and synthetic amino acid sequences are used as antigens to obtain specific antibodies. The invention also relates to the use of said antibodies in immunochemical test methods.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Es wird ein Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung beschrieben. Das Ziel wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Teilen aller Isoenzyme der Pankreas-Elastase und synthetischer Aminosäuresequenzen als Antigene für die Gewinnung spezifischer Antikörper und deren Verwendung in immunchemischen Testverfahren erreicht.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/573 C07K16/40 C12N9/66

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 622 837 A (SCHEEFERS HANS ET AL) 22 April 1997 (1997-04-22) cited in the application abstract claims -----	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2000

Date of mailing of the international search report

09/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02816

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5622837 A	22-04-1997	DE 4107765 A	30-01-1992
		AT 128734 T	15-10-1995
		AU 646476 B	24-02-1994
		AU 8100291 A	02-03-1992
		CA 2088354 A	29-01-1992
		WO 9202630 A	20-02-1992
		DE 59106634 D	09-11-1995
		DK 547059 T	19-02-1996
		EP 0547059 A	23-06-1993
		ES 2080955 T	16-02-1996
		GR 3018483 T	31-03-1996
		JP 10080272 A	31-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02816

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/573 C07K16/40 C12N9/66

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 622 837 A (SCHEEFERS HANS ET AL) 22. April 1997 (1997-04-22) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Ansprüche -----	1-19

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pellegrini, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02816

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5622837 A	22-04-1997	DE 4107765 A	30-01-1992
		AT 128734 T	15-10-1995
		AU 646476 B	24-02-1994
		AU 8100291 A	02-03-1992
		CA 2088354 A	29-01-1992
		WO 9202630 A	20-02-1992
		DE 59106634 D	09-11-1995
		DK 547059 T	19-02-1996
		EP 0547059 A	23-06-1993
		ES 2080955 T	16-02-1996
		GR 3018483 T	31-03-1996
		JP 10080272 A	31-03-1998

Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung

Die Erfindung betrifft ein diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Funktionsstörungen der Bauchspeicheldrüse können das Ergebnis unterschiedlicher Erkrankungen sein, deren Diagnose unter anderem durch die Bestimmung funktioneller Kriterien untermauert werden sollte. Die häufigsten Erkrankungen des Pankreas sind die chronisch rezidivierende und die akute Pankreatitis.

Die chronische Pankreatitis ist eine schleichende progrediente Erkrankung, bei der das funktionstüchtige Pankreasgewebe im Rahmen eines sklerotisierenden Prozesses allmählich degeneriert. Sie ist charakterisiert durch ihr klinisches Beschwerdebild (abdominelle Schmerzen, Steatorrhoe, Gewichtsverlust), typische morphologische Veränderungen der Drüse (Verkalkungen, dilatierter, unregelmäßig begrenzter Ductus pancreaticus) sowie einen progredienten exokrinen und endokrinen Funktionsverlust (Maldigestion, Diabetes mellitus). Die chronische Pankreatitis hat eine Inzidenz von 6 bis 8 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr in Westeuropa. Die Diagnose der chronischen Pankreatitis wird wegen steigenden Alkoholkonsums immer häufiger gestellt.

Zur Untermauerung klinischer und morphologischer Befunde können verschiedene funktionelle Kriterien bestimmt werden. Die sensitivste Analysenmethode stellt der Sekretin-Caerulin- bzw. Sekretin-Cholezystokinin-Test dar, der jedoch den Patienten stark belastet und einen hohen Zeitaufwand erfordert. Als indirekte Testmethoden werden Lundh-, NBT-PABA- und Pancreoauryl-Test angewendet. Auch die Bestimmung von Trypsin im Serum oder Chymotrypsin im Stuhl haben eine gewisse praktische Bedeutung. Alle diese indirekten Testmethoden haben den Nachteil einer ungenügenden Spezifität.

Die Bestimmung der Elastase 1 ist von allen verfügbaren indirekten Funktionstesten der Test mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (Löser, C., Therapie & Erfolg 1997; 1:411-413). Er hat sich in den letzten Jahren für die tägliche Praxis als Standard für die exokrinen Pankreasfunktionsdiagnostik durchgesetzt. Grundlage für diesen Test sind polyklonale Antikörpern gegen Elastase 1 (Elastase 1-RIA, Abbott) bzw. mono- und/oder polyklonalen Anti-Elastase-1-Antikörpern, die durch Immunisierung mit einem Antigen, das die Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly Asp-Ile-Arg oder immunologisch wirksame Teilpeptide davon enthält, gewonnen werden (EP 0 547 059 B1).

Pankreas-Elastase ist ein proteolytisches Verdauungsenzym. Im Vergleich zu den gebräuchlichen Parametern der Pankreasdiagnostik (z.B. Chymotrypsinaktivität im Stuhl) hat die quantitative Elastase-Bestimmung entscheidende Vorteile. Das Enzym wird ausschließlich im Pankreas gebildet und weist eine außergewöhnliche Stabilität während der Darmpassage auf, d.h., die Konzentration der Elastase spiegelt die Sekretionsleistung des Pankreas wieder.

Trotz Überlegenheit gegenüber anderen exokrinen Parametern wird mit dem herkömmlichen Elastase 1-ELISA in zu vielen Fällen Pankreas-Elastase nicht nachgewiesen, obwohl sie in beträchtlichen Konzentrationen vorhanden ist.

Ziel der Erfindung ist daher die Entwicklung eines sensitiveren Verfahrens zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung auf der Grundlage des Nachweises pankreatischer Elastase.

Durch systematische Untersuchung von Stuhlproben, die mit dem herkömmlichen ELISA nicht auf Elastase 1 reagierten, konnten nach elektrophoretischer Trennung Proben hergestellt werden, die Elastase enthielten. Die weitere Charakterisierung ergab, daß es sich bei diese Proteinen um verschiedene Isoenzyme handelt, die offensichtlich mit den kommerziellen Testantikörpern nicht erkannt werden. Es gibt offensichtlich

für dieses Enzym einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus, der sich in der Fachliteratur auch in der Beschreibung von Pankreas-Elastase 1, 2 und 3 widerspiegelt. Durch eigene Untersuchungen konnte auch nachgewiesen werden, daß zumindest 2 Isoenzyme gleichzeitig vorkommen können. Es konnte auch gezeigt werden, daß sich diese Elastasen in ihrer Konzentrationsabhängigkeit zur Pankreasschädigung genauso verhalten, wie die Elastase 1.

Im Gegensatz zu den bekannten Lösungen, die sich auf den spezifischen Nachweis der Pankreas-Elastase 1 beschränken, wurde überraschenderweise gefunden, daß durch den Nachweis möglichst jedoch alle Pankreas-Elastase-Isoformen, bekannt sind derzeit die Pankreas-Elastasen 1, 2 und 3, die Aussagefähigkeit im Bezug auf die Pankreasfunktion entscheidend verbessert werden kann. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene einzeln oder in Kombination alle bekannten Elastase-Isoenzyme oder Teilstücke von diesen oder kreuzreagierende synthetische Sequenzen repräsentieren.

Teilstücke werden vorzugsweise durch Peptidsynthese gewonnen, wobei die Aminosäuresequenz vorher mittels strukturanalytischer Methoden aus der Gesamtsequenz abgeleitet oder nach Proteinsequenzierung ermittelt wird. Wenngleich die Peptide bereits allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach

Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitopen bzw. mit allen bekannten Elastase-Isoenzymen.

Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T, hochspezifisch mit den Isoformen der Pankreas-Elastase reagieren und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase-Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung aller bekannter Elastase-Isoenzyme in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch Nachweissysteme, vorzugsweise ein immunochemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von kreuzreaktiven oder einer Kombination unterschiedlicher Epitopantikörper lassen sich schnell und spezifisch Pankreas-Elastase in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

Er dient zur Diagnose bzw. dem Ausschluß einer Pankreasbeteiligung bei Abdominalbeschwerden und exokriner Pankreasinsuffizienz.

Es gibt auch Fälle, in denen bereits die Erfassung von Elastase 1 genügt, um eine sichere Diagnose von Pankreasstörungen

stellen zu können. In diesen Fällen wird das erfindungsgemäße Verfahren folgendermaßen geführt:

Die DNA-Sequenz für humane Elastase 1 (JP 1987000276-A/6) wurde in die Aminosäuresequenz übertragen. Unter Verwendung üblicher Proteinstrukturprogramme konnten mehrere Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die eine potentielle Epitopstruktur aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q hochspezifisch Elastase 1 binden und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene zuvor mittels strukturanalytischer Methoden aus der Aminosäuresequenz abgeleitet und chemisch synthetisiert wurden. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, Teile dieser synthetischen Peptide für die Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Wenngleich die Peptide allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, sowohl monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitop bzw. der reifen Elastase 1.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase 1-epitopspezifischen Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung von Elastase 1 in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch ein immunchemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von je zwei unterschiedlichen Epitopantikörpern läßt sich schnell und spezifisch Elastase 1 in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

Ausführungsbeispiel 1 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte der reifen humanen Elastase 1 gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$ und $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$ synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Napfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 μg dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen bzw. Huhn verwendet. Nach 3maliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung des Serums wird die Spezifität der Antiseren in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den Antiseren werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Antikaninchen- bzw. Antihuhn-POD-Konjugat und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörperreaktion detektiert. Jedes Antiserum reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungsbeispiel 2 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Die Elastase 1 - Spezifität kann im Westernblot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- bzw. hochgereinigte Elastase 1 aus Stuhl mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer "Semidry-blotting"-Apparatur auf Nitrozellulose übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den 1 : 500 verdünnten anti-Peptid-Antiseren inkubiert. Nach intensiven Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundenen Antikörper werden die Membranen mit Phosphatase - markierten anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert.

Die spezifisch gebundenen sekundären Antikörper, die nach Waschen auf der Membran verblieben, werden nach Zugabe des Substrates sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich, daß in den verwendeten Proben ausschließlich Elastase nachgewiesen wurde.

Ausführungsbeispiel 3 - Bestimmung der Elastase 1 in Stuhl unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper in einem ELISA

Die Elastase 1 in Serumproben oder in Stuhlproben wird in einem Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen Epitope der Elastase 1 gerichtet ist, wird in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubation bei 4 °C über 12 h werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen PBS-Puffer, der Ethanol-amin und Tween 20 enthält, geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 min statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Ein zweiter Elastase 1 spezifischer polyklonaler Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist, wird zu der an den ersten Antikörper gebundenen Elastase gegeben.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der biotinmarkierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die Beseitigung des nicht gebundenen Streptavidins. Anschließend wird TMB als Substrat für die Peroxidase dazugegeben und nach einer definierten Zeit wird die Farbreaktion durch Zugabe von HCl abgestoppt. Gemessen wird die Änderung der optischen Dichte. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase 1-Konzentration der Probe.

Ausführungsbeispiel 4 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte von Isoformen der Pankreas-Elastase gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Napfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 µl dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen oder Huhn verwendet. nach dreimaliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung der Antikörper (Reinigung über Protein A-Säule bzw. fraktionierte Fällung) wird ihre Spezifität in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den homologen bzw. heterologen Antikörpern werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Huhn-POD-Konjugaten und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert. Jeder Antikörper reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungbeispiel 5 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Die Spezifität der Antikörper für verschiedene Isoformen der Pankreas-Elastase kann im Western-Blot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- und hochgereinigte Elastaseproben aus Stuhl und Pankreassaft mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer "semi-dry"-Blottingapparatur auf Nitrozellulose

übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den jeweiligen vorverdünnten anti-Peptid-Antikörper alleine oder in unterschiedlicher Kombination inkubiert. Nach intensivem Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundener Antikörper werden die Membranen mit alkalischer Phosphatase-markierten anti-Kaninchen-Antikörpern in einer vorher ermittelten Konzentration inkubiert. Die spezifischen sekundären Antikörper, die nach dem Waschen auf der Membran verbleiben, werden nach Zugabe von Substrat sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich, das in allen Proben mit einzelnen Antikörpern oder Antikörpergemischen Elastase detektiert werden kann, jedoch nicht jeder Antikörper alle Isoformen detektiert.

Ausführungsbeispiel 6 - Bestimmung der Pankreas-Elastase in Stuhl und Serum unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper.

Die Elastase in Serum, Plasma oder Stuhl wird mit einem Festphasen-ELISA, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Dazu werden einzelne oder ein entsprechendes Gemisch mehrerer der erfindungsgemäßen Antikörper in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation bei 4 °C werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen Ethanolamin/Tween 20-PBS-Puffer geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 Minuten statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Als Detektionsantikörper werden einzelne oder ein entsprechendes Gemisch aus mehreren erfindungsgemäßen Antikörpern verwendet, die mit Biotin konjugiert wurden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der Biotin-markierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die

Beseitigung des nicht gebundenen Streptavidins. Anschließend wird mit TMB als Substrat die Peroxidasekonzentration bestimmt. Nach Zugabe von HCl zur Beendigung der Enzymreaktion wird die Änderung der optischen Dichte gemessen. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase-Konzentration in der Probe.

Patentansprüche

1. Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung, dadurch gekennzeichnet, daß in Serum, Se- oder Exkreten eines Patienten der Gesamtgehalt aller pankreatischen Elastasen (Isoenzyme) bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung vorzugsweise mittels immunchemischer Systeme unter Nutzung mono- oder polyklonaler Antikörper, die alle Elastase-Isoenzyme einzeln spezifisch oder kreuzreaktiv erkennen, mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg, erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzten Antikörper mittels Antigenen gewonnen werden, die die kompletten Elastasen 1, 2 und 3 oder Untereinheiten davon darstellen mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg oder einer immunologisch wirksamen Teilsequenz davon.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Antigene synthetische Peptide verwendet werden, die nach Immunisierung von Tieren Antikörper induzieren, die kreuzreaktiv mehrere Elastasen erkennen, mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg.

5. Verfahren nach Anspruch 1 - 4 dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise folgende synthetische Peptide verwendet werden

NH₂-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH

NH₂-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH

NH₂-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH

NH₂-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH

NH₂-G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I-COOH

NH₂-H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V-COOH

NH₂-W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A-COOH

NH₂-V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T-COOH

NH₂-G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q-COOH

NH₂-S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N-COOH

NH₂-K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D-COOH

NH₂-G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W-COOH

NH₂-G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L-COOH

NH₂-S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y-COOH

NH₂-F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T-COOH

6. Verfahren nach Ansprüchen 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper einzeln oder in einer Kombination in immunchemischen Nachweissystemen verwendet werden.

7. Immunologische Testkits zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten, enthaltend Antikörper gemäß den Ansprüchen 2-6.

8. Verfahren zur Gewinnung von mono- und/oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch mit humaner Elastase 1 in Stuhl oder Körperflüssigkeiten reagieren und durch übliche Immunisierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide

A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q oder immunogene Teilpeptide davon als Antigen zur Immunisierung von Vertebraten, insbesondere von Kleinsäugetern und Vögeln, verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die freien Peptide vor der Immunisierung an geeignete Trägersubstanzen, vorzugsweise Hämocyanin oder Albumin koppelt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale Antikörper unter Einsatz von Hühnern als Versuchstieren produziert werden.

11. Polyklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 8 bis 10 hergestellt wurden.

12. Monoklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 8 und 9 hergestellt wurden.

13. Peptid A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N

14. Peptid Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R

15. Peptid R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N

16. Peptid G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q

17. Reinigungs- und Detektionssysteme für humane Elastase 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen der erfindungsgemäßen Antikörper enthalten.

18. Immunologische Testkits nach Anspruch 17 zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der Mucoviscidose unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten.

19. Immunologische Testkits nach Anspruch 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß 2 unterschiedliche Antikörper verwendet werden (Sandwich-ELISA).

Patent Claims

1. Diagnostic procedure for the recognition of a disorder of pancreas function - characterised by determining the overall content of all pancreatic elastases (iso-enzymes) in the serum, secretions or excretions of a patient.
2. Procedure according to claim 1, characterised by determination preferably by means of immuno-chemical systems using monoclonal or polyclonal antibodies that recognise all elastase-iso-enzymes individually and specifically or cross-reactively, with the exception of the amino-acid sequences Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg.
3. Procedure according to claims 1 and 2, characterised by the fact that the antibodies used are obtained by means of antigens consisting of the complete elastases 1, 2 and 3 or sub-units with the exception of the amino-acid sequence Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg or of an immunologically effective partial sequence thereof.
4. Procedure according to claim 3, characterised by the fact that synthetic peptides are used as antigens. After the immunisation of animals, they induce antibodies which cross-reactively recognise several elastases, with the exception of amino-acid sequences Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg.
5. Procedure according to claims 1 - 4, characterised by the fact that primarily the following synthetic peptides are used
NH₂-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH
NH₂-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH
NH₂-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH
NH₂-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NH₂-G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I-COOH
 NH₂-H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V-COOH
 NH₂-W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A-COOH
 NH₂-V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T-COOH
 NH₂-G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q-COOH
 NH₂-S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N-COOH
 NH₂-K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D-COOH
 NH₂-G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W-COOH
 NH₂-G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L-COOH
 NH₂-S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y-COOH
 NH₂-F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T-COOH

6. Procedure according to claims 1 - 5, characterised by the fact that the antibodies are used singly or in conjunction with an immuno-chemical identification system.
7. Immunological test kits for the diagnosis and progress check of diseases of the pancreas using samples of stool or body fluids containing antibodies according to claims 2-6.
8. Procedure for obtaining monoclonal and/or polyclonal antibodies that react specifically with human elastase 1 in stool or body fluids and by common immunisation procedures characterised by the fact that the peptides A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N and G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q or immunogenic partial peptides thereof as antigens are used for the immunisation of vertebrates, especially of small mammals and birds.
9. Procedure according to claim 8, characterised by the fact that before immunisation the free peptides are coupled with suitable carrier substances, ideally haemocyanine or albumin.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10. Procedure according to claims 8 and 9, characterised by the fact that polyclonal antibodies are produced using chickens as experimental animals.
11. Polyclonal antibodies, insofar as they were produced according to claims 8 to 10.
12. Monoclonal antibodies, insofar as they were produced according to claims 8 and 9.
13. Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N
14. Peptide Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R
15. Peptide R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N
16. Peptide G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q
17. Purification and detection systems for human elastase 1, characterised by the fact that contain at least one of the invention antibodies.
18. Immunological test kits according to claim 17 for the diagnosis and progress check of diseases of the pancreas and of the mucoviscidose using stool and body fluids.
19. Immunological test kits according to claims 16 and 17, characterised by the fact that 2 different antibodies are used. (Sandwich-ELISA).

THIS PAGE BLANK (USPTO)